

Bildung und biliärer Export von Glutathion-S-Konjugaten in der perfundierten Leber der Ratte

Axel Wahlländer

7
1402
-

Aus dem Institut für Physiologische Chemie, Physikalische
Biochemie und Zellbiologie der Universität München

Direktor: Prof.Dr.rer.nat.Dr.med.h.c. Th. Bücher

BILDUNG UND BILIÄRER EXPORT VON GLUTATHION-S-KONJUGATEN
IN DER PERFUNDIERTEN LEBER DER RATTE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Axel Wahlländer
aus
München
Jahr
1979

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr. H.Sies

Mitberichterstatter: Prof.Dr.rer.nat.Dr.med.h.c. Th.Bücher

Dekan: Prof.Dr. W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Nov. 1982



Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554013_0072

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1977 bis Juni 1979 durchgeführt.

Danken möchte ich allen Mitarbeitern im Labor, besonders Frau Markelstorfer und Frau Linke.

Besonderer Dank gebührt Frau Dr. S.Soboll und Herrn Dr. G.Häberle für die Unterstützung bei der experimentellen Arbeit.

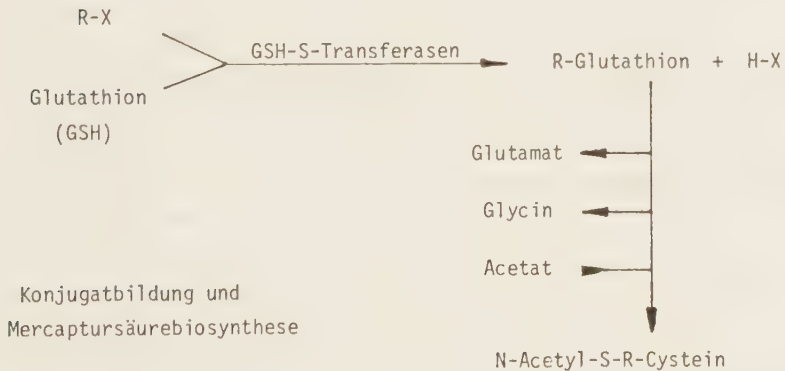
Herrn Prof.Dr.med.Helmut Sies danke ich für die Überlassung des Themas, die vielfältigen Anregungen und fruchtbaren Diskussionen.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Methodik	4
III. Ergebnisse	
1. Bildung von S-(2,4-Dinitrophenyl)-Glutathion in der perfundierten Rattenleber	10
2. Verteilung des S-Konjugats zwischen Galle und cavalem Perfusat	14
3. Choleresese verbunden mit dem Export von S-(2,4-Dinitrophenyl)-Glutathion in die Galle	20
4. Einfluß von Hypoxie und Ca^{++} -Entzug auf den biliären S-Konjugatexport	24
5. Subzelluläre Verteilung der Glutathion-S-Transferasen	26
IV. Diskussion	
1. Wahl des Substrats und des experimentellen Systems	29
2. Konjugation von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol	31
3. Verteilung des S-Konjugats zwischen Galle und cavalem Perfusat	32
4. Mechanismus der Gallenbildung	33
V. Zusammenfassung	35
VI. Literaturverzeichnis	37

I. Einleitung

Seit über 100 Jahren (5,27) sind die Mercaptursäuren, Konjugate des N-Acetylcysteins, als Endprodukte einer Reaktion bekannt, die im Körper für die Entgiftung verschiedener elektrophiler Substanzen wichtig ist. Seit ungefähr 20 Jahren weiß man, daß das reduzierte, nukleophile Glutathion den Cysteinanteil der Mercaptursäuren stellt, und daß der Anfangsschritt der Mercaptursäurebiosynthese die Konjugation des Glutathion mit dem Substrat ist (2 , 58). Die durch Leberhomogenate katalysierte Reaktion führte zur Entdeckung einer neuen Enzymgruppe, den Glutathion-S-Transferasen (7 , 9).



Lange Zeit wurden die GSH-S-Transferasen nach den jeweiligen Reaktionspartnern des Glutathion klassifiziert (12), bis es 1974 Habig et al. gelang die GSH-S-Transferasen in Untergruppen aufzutrennen (23). Dabei stellte sich heraus, daß diese Untergruppen eine weit überlappende Substratspezifität besitzen (23,28).

Die Enzyme sind vor allem in der Leber, der Niere und im Dünndarm lokalisiert (46). Die Leberzelle der Ratte kann bis zu 10 % ihres extrahierbaren Proteingewichtes aus GSH-S-Transferasen bestehen, die des Menschen bis zu 3% (28).

In der Leberzelle erfüllen die GSH-S-Transferasen verschiedene Aufgaben: Sie dienen , ähnlich dem Albumin im Plasma, als relativ unspezifische Speicher- und Bindungsproteine, zum Beispiel für Bilirubin (38). Sie sind aber auch verantwortlich für die Entgiftung und Elimination einer Vielzahl alkylierender Substanzen. Dazu zählen auch pharmakologisch wirksame Stoffe und endogen über das P-450 System entstandene Alkylantien (24,30).

Die elektrophilen Substanzen werden einerseits kovalent an den GSH-S-Transferasen gebunden, das Enzym verliert dabei seine Aktivität und wird für die Zelle nutzlos (29), andererseits werden sie mit reduziertem Glutathion konjugiert. Bei hohen Dosen kann der Verbrauch an zellulärem Glutathion durch Konjugation so hoch sein, daß das verbleibende Glutathion keinen ausreichenden Schutz vor Oxydation der Proteine mehr gewährt, und dies zur Schädigung von Zellen und auch Organen führt (19,41). Beim Tier und Menschen bewirken zum Beispiel Medikamente wie Acetaminophen und Phenacetin eine Senkung des Glutathiongehalts der Leberzellen und verursachen bei Überdosierung Leberzellnekrosen (42). Diese Erkenntnis führte bereits zu therapeutischen Konsequenzen bei akuten Vergiftungen mit diesen Substanzen: Glutathionvorstufen sollen eine ausreichende Glutathionneusynthese in der Leber gewährleisten, um die toxischen Wirkungen wie Leberzellnekrosen und Leberdystrophie zu verhindern (43).

Durch die Konjugation mit Glutathion werden die vorher meist lipophilen Substanzen hydrophil und erhalten physikochemische Eigenschaften, die eine Ausscheidung mit der Galle begünstigen (37). Ob diese quantitativ bedeutsam ist, wurde bisher noch in wenigen Fällen untersucht, wie für Diaethylmaleat (4) und Ethacrynat (30).

In der vorliegenden Arbeit soll deshalb am Beispiel eines Glutathion-S-Konjugats, das intrazellulär mit hoher Geschwindigkeit gebildet wird, um Fließgleichgewichte zu ermöglichen, und das photometrisch gut von der Ausgangssubstanz unterschieden werden kann, die Verteilung dieses Konjugats zwischen Galle und cavalem Perfusat

unter verschiedenen Parametern untersucht werden. Als Substrat wird 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol benutzt, das mit Glutathion mit Hilfe der GSH-S-Transferasen zu S-(2,4-Dinitrophenyl)-Glutathion konjugiert wird. Als experimentelles Modell verwendeten wir die hämoglobinfrei perfundierte Leber der Ratte, die metabolisch kompetent für eine solche Untersuchung ist (21,34,50).

Da bisher über die subzelluläre Verteilung der GSH-S-Transferasen wenig bekannt ist (32,44), soll auch mit Hilfe der Methode der nicht-wäßrigen Subfraktionierung der gefriergestoppten Leber die Verteilung der GSH-S-Transferasen in Cytosol und mitochondrialem Matrixraum bestimmt werden.

II. Methodik

1. Hämoglobinfreie Leberperfusion

Die Lebern 150-210 g schwerer männlicher Ratten vom Stamm Wistar wurden im offenen System nach der in (50) beschriebenen Methode perfundiert.

Die Ratten erhielten als Standardnahrung Altromin und H₂O ad libitum. Die Operation erfolgte in Pentobarbital (Nembutal^R) Narkose 1 ml pro kg Körpergewicht i.p. und gleichzeitiger i.v. Gabe von Heparin (Liquemin^R) 1000 IE/kg KG.

Das Perfusionsmedium enthielt

NaCl	115 mM	MgCl ₂	1.2 mM
KCl	5.9 mM	NaH ₂ PO ₄	1.2 mM
CaCl	1.25 mM	Na ₂ SO ₄	1.2 mM
NaHCO ₃	25 mM		

Dem Medium wurden außerdem L-Lactat (2.1 mM) und Pyruvat (0.3 mM) in Form von Natriumsalzen zugegeben. Der Perfusionsfluß betrug 3-4 ml/min pro g Leber feucht und war im einzelnen Experiment konstant, falls nicht anders angegeben. Das Perfusat wurde durch einen Schlauchoxygenator mit einem Gemisch von O₂ und CO₂ (95/5 Volumenverhältnis) äquilibriert. Die Temperatur an der Leberoberfläche betrug 37°C.

Der Gallengang wurde mit einer rostfreien Kanüle (Nr.20 Braun, Melsungen) kanüliert. Gallen- und Perfusatproben wurden in geeigneten Zeitabständen genommen.

Die Zugabe von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (Merck, Darmstadt) erfolgte mit Hilfe von Mikropumpen kontinuierlich aus Stammlösungen in Dimethylsulfoxid (=DMSO, Merck, Darmstadt); DMSO alleine zeigte in Kontrollexperimenten keinen Einfluß auf die hier gemessenen Parameter. Die Taurocholsäure (SERVA, Heidelberg) wurde im Perfusionsmedium gelöst und mit diesem zugegeben.

2. O₂-Konzentration im Perfusat

Die O₂-Konzentration im arteriellen und venösen Perfusat wurde mit einer Platinelektrode vom Typ Clark gemessen. Es wurde darauf geachtet, daß die venöse O₂-Konzentration im Bereich von 0.1-0.2 mM lag, so daß lokale Hypoxie ausgeschlossen werden konnte (49).

3. Bestimmung der Konzentration von S-(2,4-Dinitrophenyl)- Glutathion

Das S-Konjugat, S-(2,4-Dinitrophenyl)-Glutathion wurde im venösen Perfusat und in der Galle photometrisch bei 334 nm gemessen, entweder in Durchflußküvetten oder, falls bei hohen Konzentrationen wie in der Galle erforderlich, in angemessenen Verdünnungen mit 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7. Der Leerwert für Perfusat und Galle wurde von der Extinktion abgezogen, er war meist klein gegen die Extinktion durch das Konjugat.

Das Konjugat unterscheidet sich bei 334 nm gut von der unkonjugierten Ausgangssubstanz, im Absorptionsspektrum (Abb.1) ist der Extinktionsunterschied deutlich zu sehen. Für die Berechnungen verwendeten wir $\epsilon_{\text{CNB}} = 0.64 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\epsilon_{\text{Konjugat}} = 10.24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die Berechnungen in (55) wurden mit einem anderen Extinktionskoeffizienten für das Konjugat durchgeführt, der Umrechnungsfaktor für die Konjugatkonzentration in (55) ist 0.94 .

Die Extinktion des Konjugats war bei 334 nm nach eigenen Messungen im Bereich pH 3 bis pH 11 konstant, das Aufbewahren des Konjugats über 48 Stunden bei 4°C änderte die Extinktion nicht.

Falls bei den Experimenten unkonjugiertes CNB im venösen Perfusat vorhanden war, so wurde dies bei der Berechnung der Konjugatkonzentration berücksichtigt.

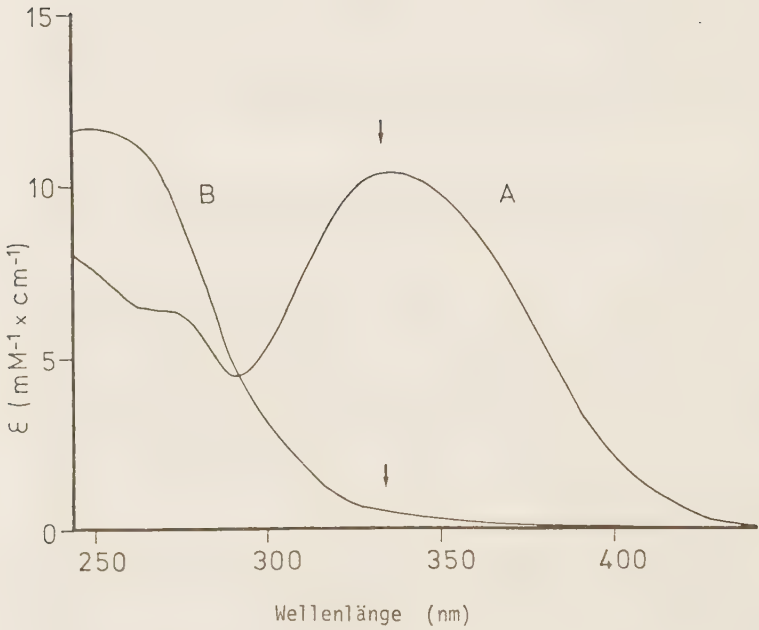
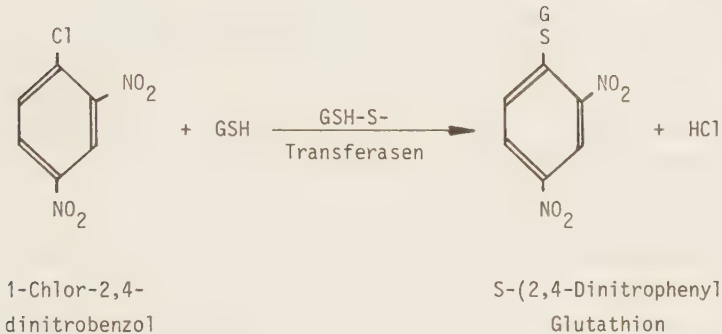


Abb.1 Absorptionsspektren des S-(2,4-Dinitrophenyl)-Glutathion (A) und des 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (B). Der Pfeil gibt die Wellenlänge an, bei der gemessen wurde (334 nm).

4. Bestimmung der Aktivität der Glutathion-S-Transferasen

Die Glutathion-S-Transferasen (E.C. 2.5.1.18) konjugieren Glutathion und 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol zu S-(2,4-Dinitrophenyl)-Glutathion unter Freisetzung von HCl.



Die Aktivität wird direkt anhand der Geschwindigkeit der Konjugatbildung photometrisch bei 334 nm bestimmt. $\Delta \epsilon$ für die Aktivitätsmessung ist $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (23).

Testansatz:

500 μl	100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 mit 1 mM EDTA
100 μl	31 mM reduziertes Glutathion
10 μl	62 mM CNB
10-50 μl	Probe, mit der gestartet wurde

Der Ansatz entspricht dem von Habig et al. (23) vorgestellten Test, außer daß die Glutathionkonzentration 5 mM ist.

Die Proben wurden doppelt bestimmt und der Leerwert (Ansatz ohne Enzym) abgezogen, da die beiden Substanzen auch nicht enzymatisch miteinander reagieren.

1 Unit ist 1 μmol S-Konjugat, das pro Minute bei 25°C gebildet wird.

5. Synthese von S-(2,4-dinitrophenyl)-Glutathion

In 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, in dem fünffach soviel reduziertes Glutathion gelöst ist, wie CNB eingesetzt wird, wird unter Rühren langsam eine CNB-Lösung in DMSO einpipetiert (Endkonzentration des CNB: 2 mM).

10 µl Leberhomogenat pro ml Lösung werden zugegeben und dann für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wird das restliche unkonjugierte CNB mit Chloroform quantitativ ausgeschüttelt (1 ml Chloroform pro 1 ml Inkubation). Der Überstand enthält das wasserlösliche Konjugat, dessen Konzentration photometrisch bestimmt wird.

6. Metabolitenbestimmung und Geräte

L-Lactat, Pyruvat und Glucose wurden nach Standardmethoden bestimmt (6). Die Gallensalzkonzentration wurde nach der Methode von Anwer et al. (1) bestimmt.

Der Glutathiongehalt der Leber und das Glutathion im venösen Perfusat und in der Galle wurden im katalytischen Test mit 5,5'-Dithio-bis(nitrobenzoat) und Glutathionreduktase (E.C. 1.6.4.2.) als Reagentien gemessen (54).

Die enzymatischen Tests wurden an einem Eppendorf Photometer Modell 6114 und einem Hitachi Photometer Modell 181 durchgeführt. Zur Messung der Konjugatkonzentration benutzten wir das Eppendorf Modell 6114, zur Messung der Absorptionsspektren einen Cary Modell.

7. Nichtwäßrige Subfraktionierung der gefriergestoppten Leber

Subfraktionierung

Die Lebern wurden wie oben beschrieben für 30 min perfundiert, dann gefriergestoppt. Der Vorgang der Subfraktionierung ist in (16,52)

und wurde so ausgeführt. Mit Hilfe der Subfraktionierung erhält man Proben, die mehr oder weniger cytosolisches bzw. mitochondriales Protein enthalten. Metabolite und Enzyme, die sich im Cytosol bzw. mitochondrialen Matrixraum befinden, müßten sich in den Proben wie cytosolisches bzw. mitochondriales Protein verteilen, vorausgesetzt, sie sind nicht an Zellstrukturen gebunden. Falls sie in beiden Kompartimenten vorhanden sind, so ergibt die Berechnung aus den einzelnen Fraktionen den prozentualen Anteil in den Kompartimenten.

Tests

Als Markerenzyme (16,52) für den mitochondrialen Matrixraum dient die Citratsynthetase (E.C. 4.1.3.7), für das Cytosol die Phosphoglyceratkinase (E.C. 2.7.2.3), deren Aktivitäten nach Standardmethoden bestimmt wurden (6,52). Ebenso wie diese Enzyme wurden in jeder Fraktion der Dichtegradientenzentrifugation der Proteingehalt (39) und die Aktivität der GSH-S-Transferasen (siehe oben) gemessen.

In Leberextrakten nach Homogenisation mit Heptan/ CCl_4 können die Enzymaktivitäten bis zu 30 % niedriger sein als ohne dieses Vorgehen. Es wird aber angenommen, daß dies keinen Einfluß auf die subzelluläre Verteilung der Enzyme hat.

Berechnungen

Der mitochondriale und cytosolische Gehalt an GSH-S-Transferasenaktivität (U/mg Protein) wurde durch Extrapolieren der Meßwerte für die einzelnen Fraktionen eines Dichtegradienten gegen reine Cytosol- und Mitochondrienfraktionen berechnet, wie in (16) beschrieben.

Der Gehalt an Aktivität wurde in Konzentration (U/ $\mu\text{l H}_2\text{O}$) umgerechnet unter der Annahme eines Wassergehaltes von 0.8 und 3.8 $\mu\text{l/mg}$ Protein im mitochondrialen bzw. cytosolischen Kompartiment (52).

III. Ergebnisse

1. Bildung von S-(2,4-Dinitrophenyl)-Glutathion in der perfundierten Rattenleber

Wie Abb.2 zeigt, führt die Infusion von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol zur Bildung eines Glutathion-S-Konjugats, des S-(2,4-Dinitrophenyl) Glutathions. Die Punkte geben die Gesamtproduktion von GSH-S-Konjugat an ohne Unterscheidung zwischen biliärem und cavalen Anteil.

Ein Gleichgewichtszustand der Konjugatausscheidung wird nach ca. 10 min erreicht. Die Substratkonzentration im arteriellen Perfusat beträgt 13 μM , was einer Infusionsgeschwindigkeit von 52 nmol/min pro g Leber entspricht. Mit der Infusion von 66 μM CNB im arteriellen Perfusat wird die Freisetzung von S-Konjugat kurzzeitig auf das fünf-fache erhöht, jedoch kein Fließgleichgewicht erreicht wie bei der niedrigeren Konzentration.

Nach Durchlaufen eines Maximums in der Konjugatausscheidung, das bei 0.27 $\mu\text{mol/min}$ pro g Leber liegt, fällt die Freisetzung ab und bildet von der 50. bis zur 60. Minute ein neues Plateau bei einem Wert von 20 nmol/min pro g Leber. Es wird angenommen, daß dieser Wert der Glutathionneusynthese in der Leber entspricht; er steht in Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren, die bei in vivo Versuchen eine Glutathionneusynthese von 33 nmol/min pro g Leber (57) und in isolierten Hepatozyten eine Neusynthese von 11-22 nmol/min pro g Leber (48) gemessen haben.

Die Fläche unter der Kurve in Abb.2 entspricht einer Freisetzung von 6.9 μmol S-Konjugat pro g Leber, d.h. daß auch die gleiche Menge Glutathion pro g Leber verbraucht wurde. Der Wendepunkt der Konjugatfreisetzung liegt bei 3.5 μmol Konjugat pro g Leber. In 10 ähnlichen Experimenten war dieser Wert 3.1 ± 0.2 μmol pro g Leber. Dies bedeutet, daß ungefähr 55 % des ursprünglich vorhandenen intrazellulären Glutathions verbraucht waren zu diesem Zeitpunkt, wie Glutathionmessungen in gefriergestoppten Lebern ergaben.

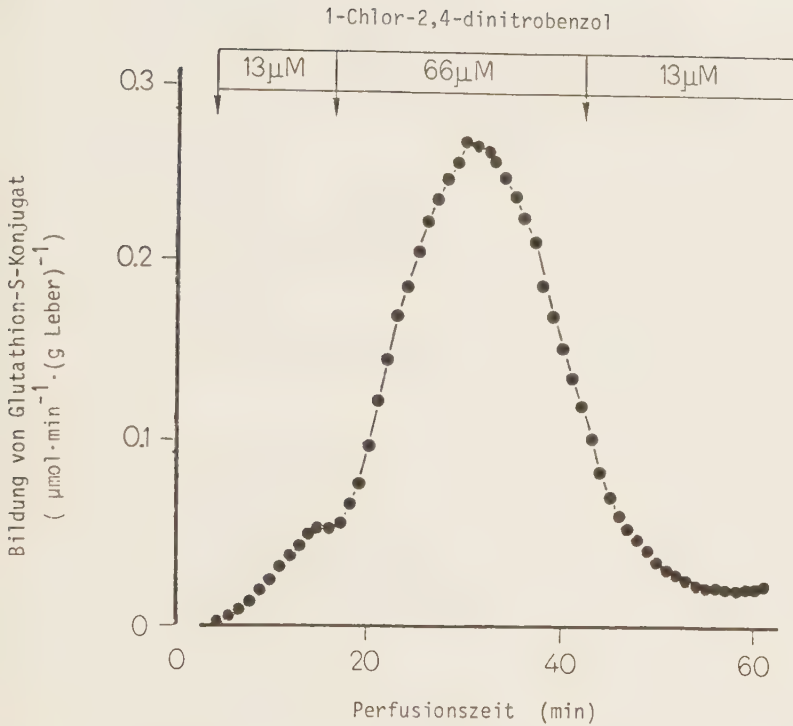


Abb.2 Bildung von S-(2,4-Dinitrophenyl)-Glutathion in der hämoglobinfrei perfundierten Leber der Ratte unter der Infusion von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol.

Die Punkte geben Gesamtwerte ohne Unterscheidung zwischen Galle und causalem Perfusat an.

Das lipophile 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol wird von der Leber bis zu einer gewissen Menge praktisch vollständig aus dem Perfusat aufgenommen. Abb.3 zeigt dies an einem Beispiel: Von der 20. bis zur 44. Minute findet sich kein oder nur sehr wenig unkonjugiertes CNB im venösen Perfusat. In diesem Zeitraum werden bei einer Infusionsgeschwindigkeit von 142 nmol CNB/min pro g Leber insgesamt 3.4 μ mol CNB pro g Leber aufgenommen. Erst mit Erreichen des Wendepunktes des S-Konjugatexports, der hier bei 2.8 μ mol pro g Leber liegt, erscheint unkonjugiertes CNB in größerer Menge im cavalen Perfusat. Mit abfallender Geschwindigkeit der Konjugation und zunehmendem Glutathionverbrauch steigt der Anteil des unkonjugierten CNB im cavalen Perfusat bis auf 70 % des infundierten CNB an. Unkonjugiertes CNB kann auch gegen Ende der CNB-Infusion nur im Perfusat, nicht aber in der Galle nachgewiesen werden.

Auch in anderen Versuchen wurde das CNB bis zu einem Wert von ca. 3.1 μ mol pro g Leber quantitativ aufgenommen und konjugiert. Dieser Wert liegt sehr nahe dem Wert für den Wendepunkt der Konjugatbildung, im einzelnen Experiment entsprachen sich diese Werte aber nicht.

Die Aufnahme von CNB bis zu diesem Punkt war unabhängig von der Infusionsgeschwindigkeit im hier untersuchten Bereich.

Nicht nur die Aufnahme des CNB in die Leber, sondern auch die Konjugation des CNB war im Bereich von 10-270 nmol/min pro g Leber linear der Infusionsgeschwindigkeit, dies ist wichtig im Hinblick auf die unten aufgeführten Experimente. Daraus kann man schließen, daß die in der Zelle vorhandene GSH-S-Transferasenaktivität genügt, um die infundierten CNB-Mengen zu konjugieren. Messungen der Aktivität in Leberhomogenaten bestätigen dies: Unter optimalen Bedingungen (23) mit 1 mM CNB und 5 mM Glutathion getestet, war die Aktivität pro g Leber 120 μ mol/min, ein großer Überschuß gegen maximal 0.3 μ mol/min pro g Leber, die im Experiment erforderlich waren.

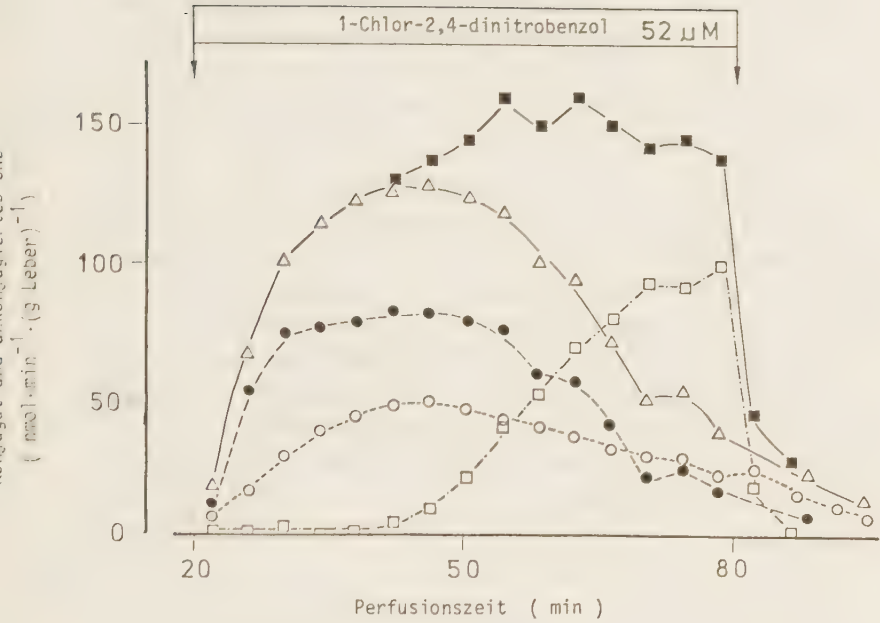


Abb.3 Erscheinen von unkonjugiertem 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol im cavalen Perfusat ($\square$) und Freisetzung von S-Konjugat in die Galle ($\bullet$) und im cavalen Perfusat ($\circ$) bei einer Substratinfusion von 52 μ M im arteriellen Perfusat. $\triangle$ gibt die Summe von S-Konjugat in Galle und Perfusat an, $\blacksquare$ die Summe von gesamten S-Konjugat und unkonjugiertem CNB.

Der O_2 -Verbrauch der Leber während der Zugabe von CNB war im wesentlichen unverändert, aber er war erniedrigt nach Verbrauch des größten Teiles des zellulären Glutathion. In 6 Perfusionsexperimenten betrug der O_2 -Verbrauch am Wendepunkt der S-Konjugatfreisetzung $2.79 \pm 0.19 \mu\text{mol/min pro g Leber}$; wenn 5-6 $\mu\text{mol S-Konjugat pro g Leber}$ produziert waren, so sank der O_2 -Verbrauch auf $2.19 \pm 0.14 \mu\text{mol/min pro g Leber}$.

Das Laktat/Pyruvat-Verhältnis im cavalen Perfusat blieb unverändert bei 7.0, wenn CNB bis zu einer Geschwindigkeit von 40 nmol/min pro g Leber infundiert wurde. Es gab aber einen leichten Anstieg bei höheren Infusionsgeschwindigkeiten, so war zum Beispiel bei 100 nmol/min pro g Leber das Verhältnis Laktat/Pyruvat 9.0 .

Eine geringe Erhöhung der Glukosefreisetzung konnte sogar bei niedrigen Infusionsgeschwindigkeiten beobachtet werden, wahrscheinlich resultiert sie aus einer vergrößerten Glykogenolyserate.

Diese relativ weniger bedeutenden metabolischen Effekte wurden hier nicht weiter untersucht.

2. Verteilung des S-Konjugats zwischen Galle und cavalem Perfusat

Um den Export des S-Konjugats in die Galle unter verschiedenen Bedingungen messen zu können, wurden Gallen- und Perfusatproben getrennt gewonnen.

Zwischen der S-Konjugatkonzentration in der Galle und im cavalen Perfusat besteht ein großer Unterschied (Abb.4). Bei einer Substratinfusion von 100 nmol/min pro g Leber ist die S-Konjugatkonzentration in der Galle ungefähr 3000-fach höher als die im cavalen Perfusat. Bei höheren Infusionsgeschwindigkeiten verminderte sich dieses Verhältnis, da mehr S-Konjugat im cavalen Perfusat ausgeschieden wurde und daher die S-Konjugatkonzentration größer war, während sich die Konzentration in der Galle nur wenig erhöhte.

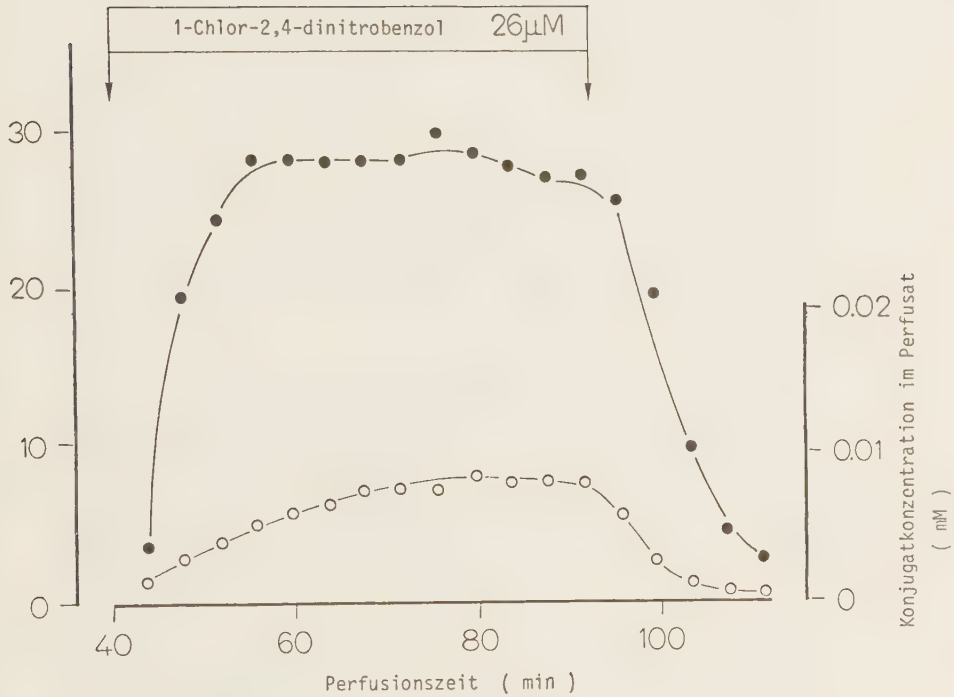


Abb.4 Einstellen von Fließgleichgewichtskonzentrationen des S-Konjugats in der Galle (●) und im cavalen Perfusat (○) während der Infusion von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol mit 26 μ M im arteriellen Perfusat

In ähnlichen Perfusionsexperimenten wurde der Perfusionsfluß bei konstanter Infusion von CNB zwischen 2.5 und 4 ml/min pro g Leber variiert. Die Ausscheidung von Konjugat im cavalen Perfusat blieb bei gleichbleibender Substratinfusion unverändert, da das Produkt aus Konjugatkonzentration im Perfusat und Perfusionsfluß konstant war; die Konzentration verhielt sich also reziprok zum Perfusionsfluß. Da sich während dieser Änderung des Perfusionsflusses weder die Konzentration des S-Konjugats in der Galle noch der Gallenfluß wesentlich änderten, kann man sagen, daß die Verteilung des S-Konjugats zwischen Galle und Perfusat unabhängig vom Perfusionsfluß ist im oben genannten Bereich.

In diesem (Abb.4) wie auch in den anderen Experimenten wurde ein Fließgleichgewicht des S-Konjugatexports und der S-Konjugatkonzentration in Galle und Perfusat erst nach 10-20 min erreicht, falls dies möglich war. Bei zu hohen Substratinfusionen konnte sich kein Fließgleichgewicht einstellen, da nach 10-20 min meist schon die Maxima der S-Konjugatfreisetzung überschritten waren. Das zeitliche Auftreten der Maxima war von der Menge des infundierten CNB abhängig.

Abb.5 zeigt die Abhängigkeit der Verteilung des S-Konjugats von der Geschwindigkeit der Substratinfusion, die im untersuchten Bereich gleich der Geschwindigkeit der Konjugatbildung ist. Bei einer S-Konjugatbildung bis etwa 30 nmol/min pro g Leber erscheint das S-Konjugat quantitativ in der Galle. Je höher die Substratinfusion war, und damit die S-Konjugatbildung, desto größer wird der Prozentsatz des im cavalen ausgeschiedenen Konjugats. Abb.5 zeigt aber auch, daß selbst bei einer hohen Infusionsgeschwindigkeit um 200 nmol/min pro g Leber fünfzig oder mehr Prozent des gebildeten S-Konjugats mit der Galle ausgeschieden werden.

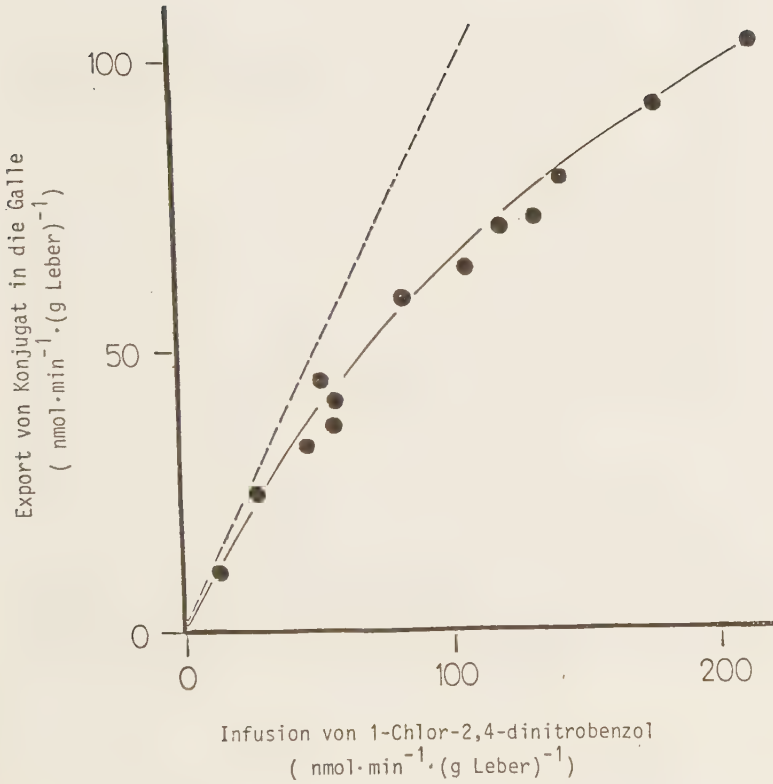


Abb.5 Verteilung der S-Konjugatfreisetzung zwischen Galle und causalem Perfusat.

Die Punkte repräsentieren Fließgleichgewichte des S-Konjugatexports in die Galle bei der angegebenen Substratinfusion. Die gesamte S-Konjugatbildung wird durch die gestrichelte Linie angegeben, so daß die Perfusatwerte die Differenz bilden.

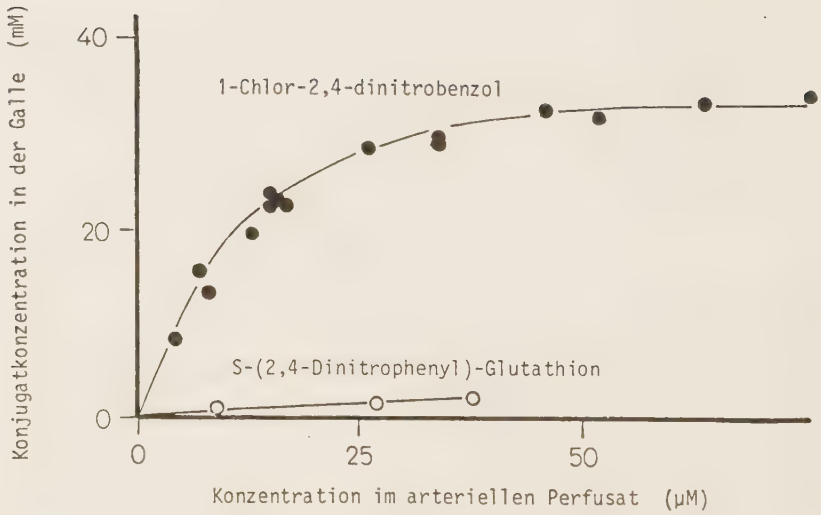


Abb.6 Abhängigkeit der biliären S-Konjugatkonzentration von der Konzentration des infundierten 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (●) bzw. des infundierten S-Konjugats (○). Jeder Punkt repräsentiert ein einzelnes Perfusionsexperiment.

Die Konzentration des S-Konjugats in der Galle erreichte 34 mM und war vom Substratangebot abhängig (Abb.6), wie aus der Sättigungskurve der S-Konjugatkonzentration in der Galle gegen die Substratkonzentration im arteriellen Perfusat hervor geht. Ungefähr 34 mM scheint auch die Grenze der Konzentrationsfähigkeit zu sein, auch mit noch höherem Substratangebot konnte keine Steigerung der Konzentration erzielt werden. Hierbei ist sicher wichtig zu beachten, daß bei so hohen Infusionsgeschwindigkeiten das zelluläre Glutathion sehr schnell verbraucht wird.

Die Infusion des S-Konjugats selbst, des S-(2,4-Dinitrophenyl)-Glutathions, führte zu nur geringen S-Konjugatkonzentrationen in der Galle im Vergleich zu ähnlich hohen Infusionen von CNB (Abb.6). Weniger als 5 Prozent des infundierten Konjugats erschienen in der Galle und im Perfusat wurde sofort ein Plateau der Konjugatkonzentration erreicht, was dafür spricht, daß fast kein S-Konjugat von der Leber aufgenommen wurde und das S-Konjugat kaum in die Leberzelle diffundiert.

Während der Freisetzung von S-Konjugat in die Galle kam es zu einer Erhöhung der biliären Glutathionkonzentration, während die Konzentration im Perfusat konstant blieb. Mit steigendem biliären Export von S-Konjugat stieg auch die Freisetzung von Glutathion in die Galle, bedingt durch erhöhte Konzentration des Glutathions und durch die S-Konjugat stimulierte Vermehrung des Gallesekretion.

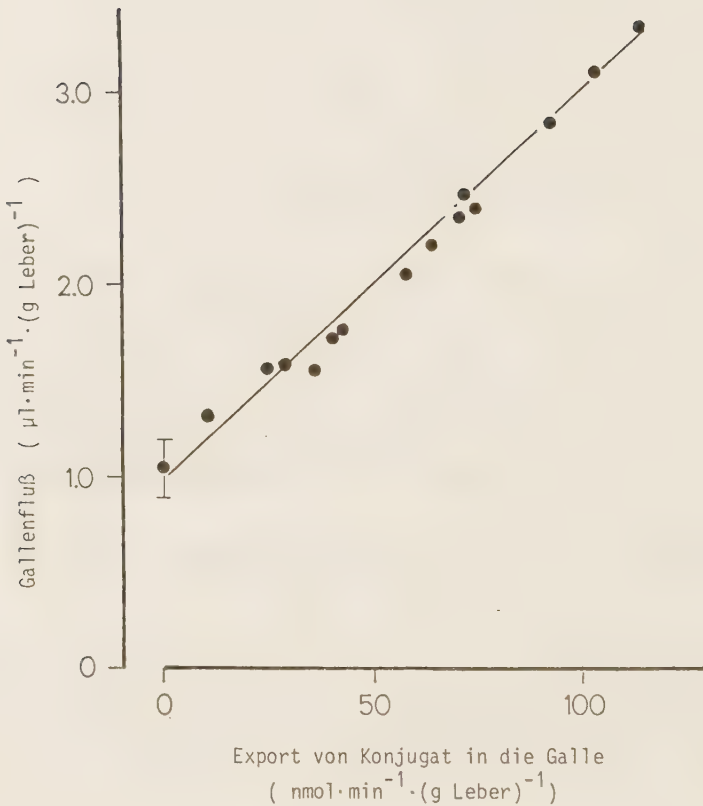


Abb.7 Abhängigkeit des Gallenflusses vom biliären Export des S-Konjugats. Der Punkt bei Null des S-Konjugatexports zeigt den durchschnittlichen Gallenfluß ($\pm$ S.D.), der während 16 min vor der Infusion von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol in 13 Perfusionsexperimenten beobachtet wurde. Die Regressionsgerade wurde für die anderen Werte berechnet.

3. Choleresese verbunden mit dem Export von S-(2,4-dinitrophenyl)- Glutathion in der Galle

Während des S-Konjugatexportes in die Galle wurde eine Stimulation des Gallenflusses beobachtet, die abhängig von der Menge des exportierten S-Konjugats war (Abb.7)

In 13 verschiedenen Perfusionsexperimenten war der Kontrollgallenfluß ohne Zusatz von CNB oder Taurocholat 1.05 ± 0.05 µl/min pro g Leber. Das Gallenvolumen, das über den Kontrollwert hinaus abgegeben wurde, stieg proportional dem exportierten S-Konjugat an. Aus der Regressionsgeraden in Abb.7 läßt sich berechnen, daß ein Nettovolumen von 19.8 µl Galle pro µmol S-Konjugat in der Galle zusätzlich abgegeben wurde.

Dieser Wert liegt höher als der, der beim Export von Gallensalzen gefunden wird. In ähnlichen Experimenten mit Infusion von Taurocholat, einem natürlichen Gallensalz, erhielten wir ein zusätzliches Gallenvolumen von 10.1 ± 1.1 µl Galle pro µmol Taurocholat in der Galle (n=4). Dieser Wert stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren überein (45).

Der Gallenfluß stimulierende Effekt beider Substanzen addiert sich (Abb.8). Der Export von S-Konjugat in die Galle wird nicht behindert. Die Menge des mit der Galle exportierten S-Konjugats/min pro g Leber entspricht der anderer Versuche ohne Infusion von Taurocholat, die S-Konjugatkonzentration in der Galle ist allerdings vermindert gegenüber den anderen Experimenten.

Infusion von Taurocholat führte interessanterweise zur Erhöhung der Geschwindigkeit des S-Konjugatexports in die Galle und zur Verminderung der Freisetzung in das cavale Perfusat (Abb.9). In der Galle erscheint mehr S-Konjugat als im cavalen Perfusat weniger gemessen wird. Ein durch erhöhten Gallenfluß stimulierter Export des in der Leber angesammelten S-Konjugats könnte dies erklären. Die S-Konjugatkonzentration in der Galle wird auch hier durch den Taurocholat stimulierten Gallenfluß verringert, der erhöhte Gallenfluß gleicht dies aber aus und vermehrt sogar den biliären S-Konjugatexport.

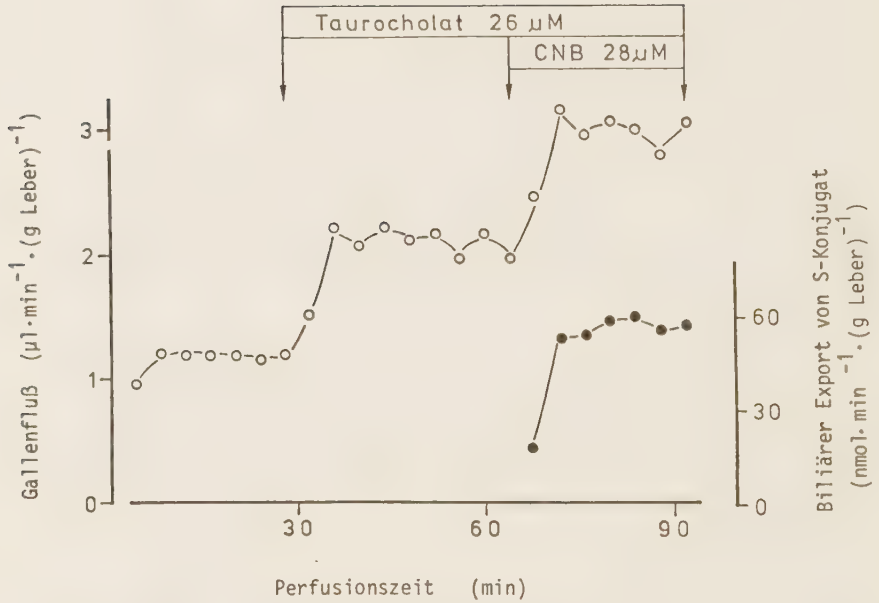


Abb.8 Addition der Stimulation des Gallenflusses durch Taurocholat und 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (○) mit Angabe des biliären S-Konjugatexports (●)

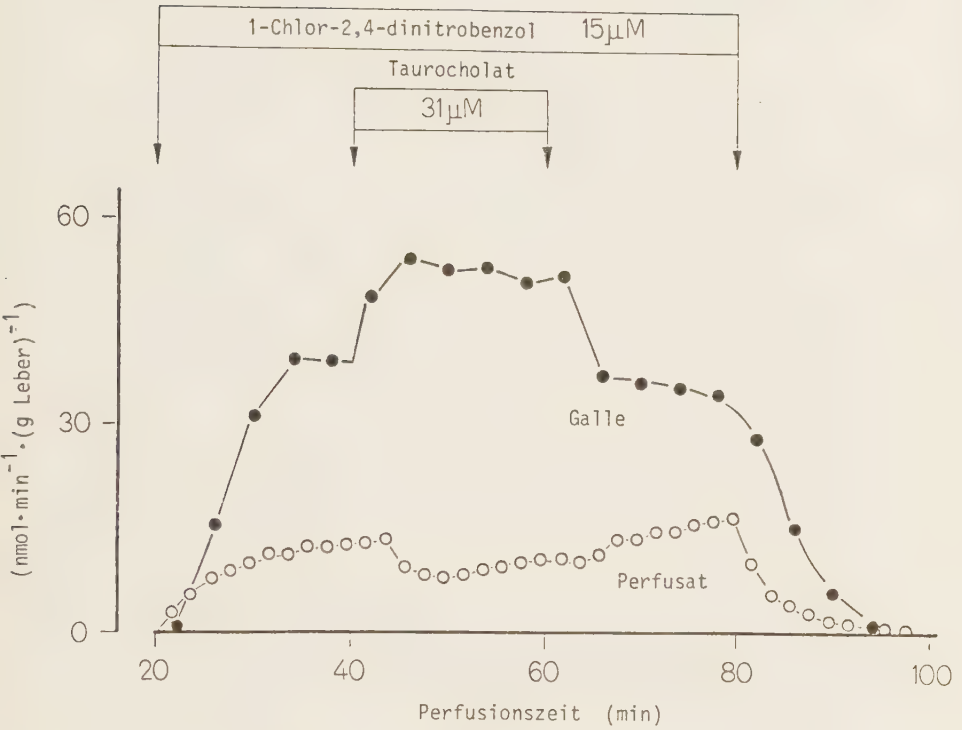


Abb.9 Stimulation des biliären Exports und Verminderung der Freisetzung von Konjugat ins Perfusat während der Infusion von Taurocholat

4. Einfluß von Hypoxie und Ca^{++} -Entzug auf den biliären S-Konjugatexport

Betrachtet man den Energiebedarf der Zelle für die Konjugation und S-Konjugatexport, so vermochten Hypoxie (N_2/O_2 im Verhältnis 1:1 statt O_2) und Anoxie (N_2 statt O_2), jeweils für 12 min angewendet, den Export von S-Konjugat in die Galle nur unwesentlich zu beeinflussen, ebenso wenig die Verteilung des S-Konjugats zwischen Galle und Perfusat. Die Bildung des S-Konjugats ist allerdings eine energieunabhängige Reaktion, nur die Neusynthese des Glutathion ist energieabhängig. Auch die Infusion von 0.2 mM Cyanid im Perfusionsmedium, einem Hemmer der Atmungskette, brachte keine größeren Änderungen dieser Parameter.

Neben dem biliären Export und der Verteilung des S-Konjugats zwischen Galle und Perfusat blieb auch der Gallenfluß während und nach der verminderten Energieversorgung im wesentlichen so hoch wie vorher, so daß man sagen kann, daß der biliäre S-Konjugatexport relativ energieunabhängig ist.

Ca^{++} -Entzug dagegen führte zu einer sehr schnellen Abnahme des Gallenflusses. Damit war auch die Ausscheidung von Konjugat in die Galle gestoppt. Wie Abb.10 zeigt, genügen für diesen Effekt 4 min, in denen die Leber Ca^{++} -frei perfundiert wurde. Der Gallenfluß geht zwar gegen Null und wird irreversibel vermindert, dies beeinflußt aber nicht die Konjugation des CNB. Was vorher an S-Konjugat in die Galle ging, das erscheint nach dem Ca^{++} -freien Intervall im cavalen Perfusat.

Während des Ca^{++} -freien Intervalls wird kurzzeitig mehr Konjugat im Perfusat ausgeschieden als CNB infundiert wird.

Die Beobachtung der irreversiblen Verminderung des Gallenflusses durch Ca^{++} -Entzug steht in Einklang mit Berichten anderer Autoren, die als Substrate für die Stimulation des Gallenflusses Taurocholat, Bilirubin und Bromsulphthalein benutzten (33).

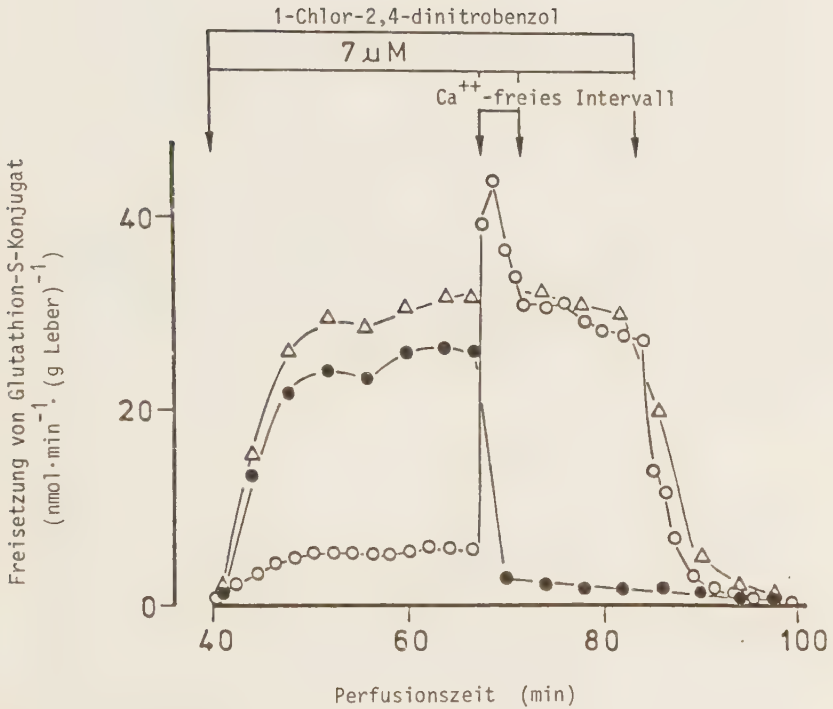


Abb.10 Wirkung des Ca^{++} -Entzugs für 4 min im venösen Perfusat auf den biliären Export (●) von S-Konjugat.

Die Perfusatkonzentration (○) stieg an, so daß bei erneuter Gabe von Ca^{++} die Gesamtfreisetzung an S-Konjugat (Δ) unverändert blieb.

F. Subzelluläre Verteilung der Glutathion-S-Transferasen

Für die Messung der Aktivität der Glutathion-S-Transferasen in den Leberextrakten, die durch nichtwäßrige Subfraktionierung der gefrier-gestoppten Leber (10, 22) gewonnen wurden, benutzten wir CNB als Substrat. Dieses Substrat erfaßt hauptsächlich die Glutathion-S-Transferasen AA, A, B und C, die Transferasen D, E und M zeigen geringe bis keine Aktivität mit CNB (23).

Jeweils 4-6 verschiedene Dichtegradienten wurden von 5 perfundierten Lebern gemacht. In den einzelnen Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation wurden die Aktivitäten der Markerenzyme und der GSH-S-Transferasen bestimmt. Aus diesen Daten wurde die Verteilung der GSH-S-Transferasen zwischen Cytosol und mitochondrialem Matrixraum berechnet (Tab.1).

Tabelle 1

Subzelluläre Verteilung der GSH-S-Transferasenaktivität, gemessen mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol als Substrat

	GSH-S-Transferasenaktivität		
	U/mg Protein	U/ μ l H ₂ O	% Gesamtaktivität
Cytosolisch	0.66 ± 0.08	0.18 ± 0.03	93.1 ± 1.9
Mitochondrial	0.08 ± 0.03	0.09 ± 0.04	6.9 ± 1.9

Die Zahlen sind Mittelwerte $\pm$ SIM (n=5), die von Ergebnisse von 4-6 verschiedenen Dichtegradienten jeder der 5 verschiedenen Lebern stammen. Die Gesamtaktivität war 0.38 ± 0.03 U/mg Leberprotein, wie nach der Homogenisation in Heptan/CCl₄ gemessen wurde.

Mit 93 % der Gesamtaktivität ist der Hauptteil der GSH-S-Transferasen im Cytosol lokalisiert, dies war schon bekannt (12). Unklar war jedoch, ob in den Zellorganellen, wie den Mitochondrien, GSH-S-Transferasenaktivität zu finden ist.

Nach unseren Ergebnissen befindet sich ungefähr 7 % der Gesamtkaktivität im mitochondrialen Matrixraum. Wenn angenommen wird, daß die mitochondrialen und cytosolischen Transferasen im entsprechenden Wasserraum verteilt sind, wird eine Aktivitätskonzentration von 0.09 bzw. 0.18 U/ μ l H_2O für diese Räume errechnet (Tab.1), wobei das M/C Verhältnis 0.5 ist.

Diese Ergebnisse können Korrekturfaktoren unterliegen: Zum einen der geringen membrangebundenen Aktivität (20,32), da bei der hier verwendeten Methode frei im Cytosol und Matrixraum lösliche Enzyme vorausgesetzt sind, zum anderen dem in II.7. erwähnten Problem der verminderten Enzymaktivität durch Subfraktionierung, und zum dritten, daß das Verteilungsmuster der GSH-S-Transferasen in beiden Räumen nicht übereinstimmen muß, wie hier angenommen wird.

Zu einem ähnlichen Ergebnis für die mitochondriale GSH-S-Transferasenaktivität kommt Kraus (32). Nach wiederholtem Waschen isolierter Mitochondrienfraktionen fand er ungefähr 5 % mitochondriale Aktivität.

Ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein dieser Enzyme im Mitochondrium ist der Nachweis der Aktivität der nichtselenabhängigen Glutathionperoxidase in isolierten Mitochondrien von Selenmangerratten, den Sies et al. führten (50). Die Glutathion-S-Transferase B wurde als nichtselenabhängige Glutathionperoxidase identifiziert (36,47). Ungefähr 5 % der Kontrollaktivität mit t-Butylhydroperoxid als Substrat wurde gefunden, aber keine mit H_2O_2 als Substrat. Es ist bekannt, daß die nichtselenabhängige Glutathionperoxidase nur t-Butylhydroperoxid umsetzt, nicht aber H_2O_2 . Erst neulich jedoch wurde in einer Arbeit (35) festgestellt, daß keine Aktivität in subzellulären Organellen zu finden sei, die Ergebnisse schlossen aber einen mitochondrialen Anteil von 5 % nicht aus.

Obwohl die Aktivität pro μ l H_2O Verteilungsraum im mitochondrialen Matrixraum niedriger liegt als im Cytosol und die obigen Korrekturen auch noch darauf Einfluß haben können, so läßt sich doch sagen, daß die Aktivitäten so ähnlich sind, daß die Zelle in beiden Räumen ,

auch in Betracht des fast gleichen Glutathiongehalts in beiden Räumen (56), die Fähigkeit hat, sich auch in den Mitochondrien durch S-Konjugation wirksam vor schädlicher Alkylierung zu schützen.

IV. Diskussion

1. Wahl des Substrats und des experimentellen Systems

Literatur, die die Glutathion-S-Transferasen und ihre Reaktionen mit den verschiedensten Substraten behandelt, ist in Übersichtsarbeiten angegeben (12,29). Außer in vitro Versuchen, in denen die Enzyme in Gewebshomogenaten oder gereinigt untersucht wurden, gibt es auch eine Reihe von in vivo Versuchen, zum Beispiel wurde die Menge der Mercaptursäuren, der Abbauprodukte der Glutathion-S-Konjugate, nach Gabe alkylrierender Substanzen im Urin der Tiere bestimmt (9). Auch mit Hilfe künstlicher Gallengangsfisteln (4) wurde die Verteilung der S-Konjugate zwischen Galle, Plasma und Urin untersucht.

Um physiologische Parameter im ausreichenden Maße zu wahren, wählten wir die hämoglobinfrei perfundierte Leber der Ratte als Mittelweg zwischen in vitro und in vivo Experimenten. An ihr kann die Konjugation einer alkylierenden Substanz durch die Glutathion-S-Transferasen, der Export des S-Konjugats in die Galle und das Verhalten des Gallenflusses unter kontrollierten, aber doch relativ physiologischen Bedingungen, vor allem im Zusammenspiel mit der Gallenproduktion, untersucht werden.

Versuche, die Rolle der biliären Eliminierung potentiell toxischer Substanzen in biochemischen Parametern zu beschreiben, sind relativ schwierig, da der Mechanismus der Gallenbildung gegenwärtig noch wenig geklärt ist (17,18,37). Auch dies ist ein Grund, ein einfaches, aber metabolisch kompetentes Modell (22,34,50) zu wählen, um einige Eigenschaften des biliären Exports des S-Konjugats von CNB zu beschreiben.

Die hämoglobinfrei perfundierte Rattenleber behält die wichtigen Charakteristika des biliären Transports bei, eingeschlossen die Geschwindigkeit des Gallenflusses und der Transportkapazität, z.B. für laurocholat (45). Der Gallenfluß ist außerdem in einem weiten Bereich

unabhängig vom Perfusionsfluß. Es erscheint daher möglich, die Vorteile dieses einfachen Modells bei der Untersuchung des Mechanismus der Gallenbildung bei biliärem Export eines S-Konjugats anzuwenden.

Das S-Konjugat von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol wird von den Glutathion-S-Transferasen der Rattenleber verglichen mit anderen Substraten mit hoher Aktivität gebildet (23). Das S-Konjugat unterscheidet sich photometrisch leicht von der Ausgangssubstanz, ein weiterer Vorteil gegenüber anderen S-Konjugaten; der hohe Extinktionskoeffizient läßt auch Messungen kleinster Konzentrationen in Galle und Perfusat zu.

Wie schon in III.5. erwähnt, wird das CNB hauptsächlich von den Glutathion-S-Transferasen AA, A, B und C umgesetzt. Sie bilden mit über 90 % der zellulären Transferasen den weitaus größten Teil dieser Enzyme in der Rattenleber (23, 29). Die GSH-S-Transferasen D, f und M spielen bei der Konjugation von CNB nur eine geringe Rolle, sie haben auch nur geringen Anteil an der Menge der GSH-S-Transferasen der Leberzelle (23).

Gegenwärtig ist auf Grund der überlappenden Substratspezifität der GSH-S-Transferasen kein Substrat verfügbar, das geeignet wäre ein einzelnes Enzym spezifisch zu erfassen. Es gibt aber bisher auch noch keines, das alle GSH-S-Transferasen gleichmäßig erfaßt. Daher wird in dieser Arbeit, mit CNB als Substrat, praktisch nur das Verhalten der GSH-S-Transferasen AA, A, B und C charakterisiert, und die subzelluläre Verteilung der GSH-S-Transferasenaktivität ist eine aus einer Reihe möglicher, die mit jeweils verschiedenen Substraten erhalten werden können.

Ein weiterer Punkt für die Verwendung des CNB war, daß der begrenzende Schritt in der Reaktion bis zum Export des S-Konjugats nicht die Aufnahme des Substrats in den Hepatozyten war, dies geschieht wahrscheinlich durch einfache Diffusion des lipophilen CNB. Einfache Rückdiffusion und Sättigung des intrazellulären Raumes würde auch erklären, daß nach Überschreiten einer CNB-Aufnahme von ca. 3.1 µmol pro g Leber und mit steigendem Glutathionverbrauch unkonjugiertes CNB in größerem Maße im cavalen Perfusat erscheint.

2. Konjugation von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol

Die GSH-S-Transferasen konjugieren mit hoher Aktivität CNB und Glutathion, die auch nichtenzymatisch miteinander reagieren. Bis zu 270 nmol/min pro g Leber wird infundiertes CNB konjugiert und als S-Konjugat freigesetzt. Der S-Konjugatexport mit hoher Geschwindigkeit wird allerdings nicht lange konstant gehalten, seine Dauer hängt von der Geschwindigkeit der CNB-Infusion ab, und damit auch vom Verbrauch an Glutathion durch Konjugation. Wir nehmen an, daß die Verminderung des intrazellulären Glutathiongehalts für den Rückgang des S-Konjugatexports bei hoher CNB-Infusion verantwortlich ist, der bei ca 3.1 µmol konjugiertem Glutathion pro g Leber beobachtet wird (Abb.2,3).

Der K_M für Glutathion ist 0.2 mM bei den GSH-S-Transferasen A und B, 0.1 mM bei C, die den Hauptanteil der GSH-S-Transferasen in der Zelle bilden, so daß bei starker Verminderung der Glutathionkonzentration eine Hemmung der Enzymaktivität eintreten könnte (23). Allerdings ist der K_M selbst nach Verbrauch über der Hälfte des zellulären Glutathion noch immer zehnmal kleiner als die Konzentration des verbleibenden Glutathion und müßte daher maximale Aktivität gewährleisten. Higashi et al. (25) beschrieben einen langsam und einen schnell mobilisierbaren Glutathionpool in der Rattenleber, vielleicht übernimmt dieser schnell mobilisierbare Pool die Konjugation bis zu einer bestimmten Menge an Substrat und das restliche Glutathion in der Zelle wird erst allmählich herangezogen.

1-Chlor-2,4-dinitrobenzol ist fähig Proteine zu alkylieren, auch die GSH-S-Transferasen (23,29), und es kann daher zu Artefakten in Nebenreaktionen führen. In der Dermatologie ist CNB als sehr potenter Kontakt-Sensitizer bekannt, der mit Hautproteinen eine kovalente Bindung eingehen kann (15,21). Dadurch wird CNB zum Vollantigen und verursacht eine Lymphozytenanreicherung an den betreffenden Hautstellen. Es wird versuchsweise eingesetzt um Hautmetastasen von Melanomen durch Immuninduktion zu zerstören (11). In der Behandlung der Mamma- und Prostatakarzinome ist es mit Erfolg für die Be-

urteilung der Prognose und des Therapieerfolgs verwendet worden, da es wegen seiner hohen Sensibilisierungsrate bisher am besten über den Immunstatus eines Patienten Auskunft gibt (31,14). Trotz all dieser Effekte kann die nichtspezifische Alkylierung der GSH-S-Transferasen durch CNB unter den hier gewählten Bedingungen als vernachlässigbar betrachtet werden, vor allem in Bezug auf die gemessenen Gallenparameter. Fließgleichgewichte in biliärem Export und biliärer Konzentration von S-Konjugat wurden bis zu einer Stunde beibehalten, und sogar bei Infusion hoher Substratkonzentrationen stieg der Nettogallenfluß linear an (Abb.7). Noch dazu waren alle Effekte reversibel.

Das verringerte Energieangebot bei Hypoxie und Cyanidinfusion hatte keinen Einfluß auf die Konjugationsgeschwindigkeit, die Konjugationsreaktion selbst ist energieunabhängig.

Kleinere metabolische Effekte, zum Beispiel wie oben erwähnt auf die Glukosefreisetzung und das Laktat/Pyruvat-Verhältnis wurden beachtet.

Es erscheint offensichtlich, daß die hohe GSH-S-Transferasenaktivität mit 1000-fachem Überschuß über die höchste verwendete Infusionsgeschwindigkeit genügt, um die intrazelluläre CNB-Konzentration effektiv niedrig zu halten, solange noch genügend Glutathion in der Zelle ist.

3. Verteilung des S-Konjugats zwischen Galle und caevalem Perfusat

Das S-Konjugat wird bei niedriger Geschwindigkeit der S-Konjugatbildung quantitativ in der Galle ausgeschieden (Abb.5). Bei einem Gesamtexport von 30 nmol S-Konjugat/min pro g Leber werden mehr als 90 % des S-Konjugats in die Galle exportiert, und erst bei höheren Infusionsgeschwindigkeiten wird der Anteil des S-Konjugats im caevalem Perfusat bedeutsam.

Der begrenzende Schritt des biliären Exports liegt nicht in der Bereitstellung von S-Konjugat oder von Substrat für die Konjugation, sondern an der kanalikulären Seite des Hepatozyten. Obwohl bei einer Infusion von 100 nmol CNB/min pro g Leber alles Substrat umgesetzt wird, werden nur 60 % des S-Konjugats mit der Galle ausgeschieden (Abb.5).

Da sich der Gallenfluß und die Geschwindigkeit des biliären Exports im Bereich bis zu 120 nmol S-Konjugat/min pro g Leber linear verhalten (Abb.7), kann gesagt werden, daß der S-Konjugatexport beim Schritt der Bereitstellung und Freisetzung von Gallenflüssigkeit gehemmt wird, wenn man annimmt, daß die Freisetzung von S-Konjugat ins cavale Perfusat ein passives Überlaufen des S-Konjugats aus der Zelle ist. Dieses Problem erfordert jedoch weitere Untersuchungen, da die Möglichkeit besteht, daß das cavale S-Konjugat nicht nur über die Plasmamembran ins cavale Perfusat gelangt, die an den sinusoidalen Raum grenzt, sondern auch zuerst in die Galle und dann dort parazellulär in umgekehrter Richtung in den sinusoidalen Raum gelangen kann.

Dieser parazelluläre Fluß könnte auch das Erscheinen des hydrophilen S-(2,4-Dinitrophenyl)-Glutathion in der Galle erklären, das nur zu einem sehr kleinen Teil in der Galle ausgeschieden wird. Es kann aber auch direkt von der Zelle aufgenommen worden sein und wie endogen erzeugtes S-Konjugat in die Galle exportiert werden.

Die Aufgabe das S-Konjugat und dessen Abbauprodukte aus dem Plasma und damit aus dem Körper zu entfernen übernimmt zum größten Teil die Niere, wie Untersuchungen über die Ausscheidung von Mercaptursäuren ergeben haben (9).

4. Mechanismus der Gallenbildung

Export von S-(2,4-dinitrophenyl)-Glutathion mit der Galle stimuliert einen Nettotransport von 19.8 µl Gallenflüssigkeit pro µmol S-Konjugat, mit anderen Glutathion-S-Konjugaten werden ähnliche Werte beobachtet, z.B. mit Bromsulphthalein (3) und Diaethylmaleat (4), bei denen der Nettotransport pro µmol aber etwas niedriger war.

1 μmol S-Konjugat pro 19.8 μl Galle entspricht einer Konzentration von 51 μM im zugehörigen Wasserkompartiment, das mit dem Transport in die Galle verbunden ist. Dies gilt für die Annahme, daß ein der Exozytose ähnlicher Mechanismus den S-Konjugatexport übernimmt. Ebenfalls möglich wäre erleichterte Diffusion zur Galle hin oder ein aktiver Transport der gallengängigen Substanzen. Gegen letzteres spricht die relative Unabhängigkeit des biliaren Exports von der Energieversorgung, für die erleichterte Diffusion die frei im Cytosol gelösten GSH-S-Transferasen und die gute Wasserlöslichkeit des S-Konjugats.

Über die Messung der bisher noch unbekannten intrazellulären Konzentration des S-Konjugats könnte die Konzentrationsdifferenz zwischen Galle und Perfusat bestimmt werden. Dies könnte Aufschluß über die Art des Konjugatexports und den Mechanismus der Gallenbildung geben.

Daß die Stimulation des Gallenflusses auch auf osmotischer Basis beruhen kann, unterstützen Befunde, die eine Vermehrung der Anionmenge in der Galle während der S-Konjugation von Diaethylmaleat nachgewiesen haben (4). Diese vermehrte Anionenmenge wird nicht ausgeglichen durch vermehrte Freisetzung von HCO_3^- und Cl^- , so daß das sogenannte "anion gap" entsteht.

Die Cholestase und die darauf folgende Freisetzung des S-Konjugats in das Perfusat durch Ca^{++} -freie Perfusion könnten auf einer Erhöhung der Permeabilität interzellulärer Verbindungen, die eine Regurgitation der Galle in das Perfusat ermöglicht, und einer Änderung der Plasmamembranstruktur beruhen. Hoke et al. (26) vermuten, daß die Änderung der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration intrazelluläre Mechanismen stört, die für den Transport cholephiler Substanzen zum Gallenpol der Zelle verantwortlich sind. Dagegen spricht, daß ein großer Teil des Calciums an der Plasmamembran gebunden ist (13), und Ca^{++} -Entzug daher eher zu schnellen Änderungen in der Plasmamembranstruktur führen kann, weniger aber die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration beeinflusst.

V. Zusammenfassung

1. Um die Bildung eines Glutathion-S-Konjugats, dessen Export in die Galle und Verteilung zwischen Galle und Extrazellulärraum zu untersuchen, wählten wir die hämoglobinfrei perfundierte Leber der Ratte als metabolisch kompetentes Modell. Als Substrat wurde 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol benutzt, da es von den Glutathion-S-Transferasen mit hoher Aktivität zum S-Konjugat, dem S-(2,4-Dinitrophenyl)-Glutathion umgesetzt wird, das sich photometrisch leicht von der Ausgangssubstanz unterscheiden läßt.

2. Die Bildung des S-(2,4-Dinitrophenyl)-Glutathion war der Geschwindigkeit der Infusion von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol bis zu 270 nmol/min pro g Leber gleich. Fließgleichgewichte im S-Konjugat-export wurden gehalten, bis der Glutathiongehalt der Leber auf 45 % des Kontrollwertes abgesunken war.

3. Der biliäre Export des S-Konjugats war bei niedriger Geschwindigkeit der S-Konjugatbildung, bis ca. 30 nmol/min pro g Leber, quantitativ, und erst mit Erhöhung der Bildungsgeschwindigkeit stieg die Freisetzung ins cavale Perfusat an. Die maximale S-Konjugatkonzentration in der Galle betrug 34 mM, sie war von der S-Konjugatbildung abhängig.

4. Während des biliären Exportes von S-Konjugat wurde eine Cholerease von 19.8 µl zusätzliches Gallenvolumen pro µmol exportiertes S-Konjugat beobachtet. Dies würde einer Konzentration von 51 mM S-Konjugat in dem zugehörigen Wasserkompartiment entsprechen, das mit dem Transport in die Galle in Beziehung steht, z.B. einem Exozytosevesikel bei Annahme eines der Exozytose ähnlichen Mechanismus der Gallenbildung. Export und Verteilung des S-Konjugats waren von der Energieversorgung relativ unabhängig.

5. Im mitochondrialen Matrixraum befindet sich ca. 7 % der zellulären Glutathion-S-Transferasenaktivität mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol als Substrat, im Cytosol 93 %, so daß auch in den Mitochondrien durch S-Konjugation Schutz vor Alkylierung gewährleistet ist.

6. Das hier beschriebene System ist geeignet für die weitere Erforschung der Eigenschaften der Gallebildung und der Entgiftung durch die Glutathion-S-Transferasen. Ersteres zeigt sich auch in der hohen Empfindlichkeit, mit der Änderungen der S-Konjugatkonzentration im cavalen Perfusat, z.B. bei Ca^{++} -Entzug, gemessen werden können.

VI. Literaturverzeichnis

- 1 Anwer,M.S.,Kroker,R. & Hegner,D. (1975) Biochem.Biophys.Res.
Commun. 63, 603-609
- 2 Barnes,M.M.,James,S.P. & Wood,P.B. (1959) Biochem.J. 71, 680-690
- 3 Barnhart,J.L. & Combes,B. (1976) Am.J.Physiol. 231, 399-407
- 4 Barnhart,J.L. & Combes,B. (1978) J.Pharm.Exptl.Ther. 206, 614-623
- 5 Baumann,F. & Preusse,C. (1879) Ber.Dtsch.Chem.Ges. 12, 806-810
- 6 Bergmeyer,H.U. ed. (1974) Methoden der enzymatischen Analyse
3rd edn, pp 471-472 Verlag Chemie, Weinheim
- 7 Booth,J.,Boyland,E. & Sims,P. (1961) Biochem.J. 79,516-524
- 8 Boyland,E. & Chasseaud,L.F. (1969) Advan.Enzymol. 32, 172-219
- 9 Bray,H.G.,Franklin,T.J. & James,S.P. (1959) Biochem.J. 71, 690-695
- 10 Bücher,Th. (1955) Methods Enzymol. 1, 415-422
- 11 Burg,G. & Braun-Falco,O. (1977) Dtsch.Med.Wschft. 6, 210-212
- 12 Chasseaud,L.F. (1974) in: Glutathione , Flohè,L.,Benöhr,H.Ch.,
Sies,H.,Waller,H.D. & Wendel,A. eds., pp 90-108
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- 13 Claret-Berthon,B.,Claret,M. & Mazet,J.L. (1977) J.Physiol.
272, 529-552
- 14 Cunningham,T.J. (1976) Cancer 97, 1696-1700
- 15 Eisen,H. & Tabachnik (1958) J.Exptl.Med. 108, 773-776
- 16 Elbers,R.,Heldt,H.W.,Schmuck,P.,Soboll,S. & Wiese,H. (1974)
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chemie 353, 378-393
- 17 Forker,E.L. (1977) Annu.Rev.Physiol. 39, 323-347
- 18 Forker,E.L. & Runyon,B.A. (1978) Gastroenterology 75, 535-537
- 19 Gillette,J.R.,Mitchell,J.R. & Brodie,B.B. (1974) Ann.Rev.Pharmacol.
14, 271-288
- 20 Glatt,H. & Oesch,F. (1977) Arch.Toxicol. 39, 87-96

- 21 Godfrey,H.P. & Baer,H. (1971) J.Immunol. 106, 431-435
- 22 Graf,J. & Peterlik,M. (1976) in: The Hepatobiliary System
Taylor,W. ed. pp 43-58 Plenum Press, New York
- 23 Habig,H.W.,Pabst,M.J. & Jakoby,W.B. (1974) J.Biol.Chem.
249, 7130-7139
- 24 Heidelberger,C. (1975) Ann.Rev.Biochem. 44, 79
- 25 Higashi,T.,Tateishi,N.,Naruse,A. & Sokomoto,Y. (1977)
J.Biochem. 82, 117-124
- 26 Höke,H.,Krell,H. & Pfaff,E. (1979) Arch.Toxicol.
- 27 Jaffe,M. (1879) Ber.Dtsch.Chem.Ges. 12, 1092-1098
- 28 Jakoby,W.B.,Ketley,J.N. & Habig,W.H. (1976) in: Glutathione
Metabolism and Function , Arias,I.M. & Jakoby,W.B. eds.
pp 213-225 Raven Press, New York
- 29 Jakoby,W.B. (1978) Advan.Enzymol. 46, 383-414
- 30 Klaasen,G.D. & Fitzgerald,T.J. (1974) J.Pharm.Exptl.Ther.
191, 548-556
- 31 Klippel,K.F.,Wale,H.P.,Kreutz,G. & v.Moltke,T. (1978)
Münch.Med.Wschr. 120, 1027-1028
- 32 Kraus,P. (1978) Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 359, 289
- 33 Krell,H.,Höke,H. & Pfaff,E. (1978) Naunyn-Schmiedeberg's
Archiv.Pharmacol. 303, 287-293
- 34 Kroker,R.,Anwer,M.S. & Hegner,D. (1978) Naunyn-Schmiedeberg's
Archiv.Pharmacol. 303, 287-293
- 35 Lawrence,R.A. & Burk,R.F. (1978) J.Nutrit. 108, 211-215
- 36 Lawrence,R.A.,Parkhill,L.K. & Burk,R.F. (1978) J.Nutrit
108, 981-987
- 37 Levine,W.G. (1978) Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol. 18, 81-96

- 38 Litwak,G.,Ketterer,B. & Arias,I.M. (1971) *Nature* 234, 466
- 39 Lowry,C.H.,Rosebrough,N.J.,Harr,A.L. & Randall,R.J. (1951)
J.Biol.Chem. 193, 265-275
- 40 Miller,E.C. & Miller,J.A. (1974) in: *Molecular Biology of Cancer*
pp 377 Husch,H. ed. Academic Press, New York
- 41 Mitchell,J.R.,Jollow,D.J.,Potter,W.Z.,Gillette,J.R. & Brodie,B.B.
(1973) *J.Pharmacol.Exptl.Ther.* 187, 211-217
- 42 Mitchell,J.R.,Potter,W.Z.,Hinson,J.A. & Jollow,D.J. (1974)
Nature 251, 508-511
- 43 Mitchell,J.R.,Thorgeirsson,S.S.,Potter,W.Z.,Jollow,D.J. &
Keiser,H. (1974) *Clin.Pharmacol.Ther.* 16, 676-687
- 44 Morgenstern,R.,DePierre,J. & Ernster,L. (1979) *Biochem.Biophys.*
Res.Comm. 87, 657-663
- 45 Paumgartner,G.,Herz,R.,Sauter,F. & Schwarz,H.P. (1974)
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 285, 165-174
- 46 Pinkus,L.M.,Ketley,J.N. & Jakoby,W.B. (1979) *Biochem.Pharmacol.*
- 47 Prohaska,J.R. & Ganther,H.E. (1977) *Biochem.Biophys.Res.*
Commun. 76, 437-445
- 48 Reed,D.J. & Orrenius,S. (1977) *Biochem.Biophys.Res.Comm.*
77, 1257-1264
- 49 Sies,H. (1977) *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 358, 1021-1032
- 50 Sies,H. (1978) *Methods Enzymol.* 52, 48-59
- 51 Sies,H. & Moss,K.M. (1978) *Eur.J.Biochem.* 84, 377-383
- 52 Soboll,S.,Scholz,R. & Heldt,H.W. (1978) *Eur.J.Biochem*
87, 377-390
- 53 Sorof,S. & Young,E. (1967) *Methods Cancer Res.* 3, 467

- 54 Tietze, F. (1969) Anal. Biochem. 27, 502-522
- 55 Wahländer, A. & Sies, H. (1979) Eur. J. Biochem. 96, 441-446
- 56 Wahländer, A., Soboll, S. & Sies, H. (1979) FEBS Letters
97, 138-140
- 57 White, I. N. H. (1976) Chem.-Biol. Interactions 13, 333-342
- 58 Wood, J. L. (1970) in: Metabolic Conjugation and Metabolic
Hydrolysis, Fishman, W. H. ed. Vol. 2 pp 261-299
Academic Press, New York

Lebenslauf

Am 18. Mai 1956 wurde ich als zweites Kind des praktischen Arztes und Geburtshelfers Dr. med. Hasso Wahlländer und seiner Frau Erika Wahlländer, geborene Schmieder, in München geboren.

- | | |
|------------|---|
| Sept. 1962 | Besuch der Volksschule Pullach |
| Sept. 1966 | Übertritt an das humanistische Theresien-Gymnasium
in München |
| Mai 1975 | Abitur am Theresien-Gymnasium |
| Okt. 1975 | Beginn des Studiums der Medizin an der
Ludwig Maximilians-Universität zu München |
| 1977 | Physikum |
| 1978 | I. Staatsexamen |
| 1980 | II. Staatsexamen |
| 1981/82 | Praktische Ausbildung: |
| | Ophthalmologie : Augenklinik der Universität,
Mathildenstraße, München |
| | Innere Medizin : Medizinische Klinik II,
Klinikum Großhadern |
| | Chirurgie : Chirurgische Klinik,
Klinikum Großhadern |
| April 1982 | III. Staatsexamen, mündlicher und schriftlicher Teil |
| Juni 1982 | Approbation |
| Aug. 1982 | Assistent am Institut für Klinische Pharmakologie
Universität Bern |

